

氏 名	きよしま ちひろ 清島 千尋		
学 位 の 種 類	博士（医学）		
報 告 番 号	甲第 1900 号		
学位授与の日付	令和 3 年 9 月 13 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）		
学 位 論 文 題 目	MicroRNAs miR-4535 and miR-1915-5p in amniotic fluid as predictive biomarkers for chorioamnionitis （絨毛膜羊膜炎を予測するバイオマーカーとしての羊水中 miR-4535 と miR-1915-5p）		
論 文 審 査 委 員	（主 査）	福岡大学	教授 高田 徹
	（副 査）	福岡大学	教授 白澤 専二
		福岡大学	講師 伊藤 竜太

内 容 の 要 旨

【目的】

絨毛膜羊膜炎は、胎児由来の膜の炎症を特徴とする周産期疾患であり、早産、新生児敗血症、および新生児の脳疾患を引き起こす。しかし、臨床的所見では絨毛羊膜炎を正確に予想できないため、母体と胎児の転帰を予測することは非常に困難である。早産が漸増している現代において、絨毛羊膜炎を予測する正確で簡便な検査が必要と言われていたが、確立した診断方法はない。

マイクロ RNA (miRNA) は、種々の感染症に関与していると言われている。血清中の miRNA のいくつかは、胎盤機能不全の早期診断の潜在的なバイオマーカーとして報告されており、胎児発育不全と子癇前症との関連も報告されているが、絨毛膜羊膜炎と羊水中の miRNA の発現の間の関連についての報告はない。

近年、羊水中の 16S リボソーム DNA (16S rDNA) を用いて、絶対定量およびメタゲノムシーケンシングを行い、絨毛膜羊膜炎を正確に診断できることを我々は報告した。妊娠中に子宮内感染を引き起こすのは主に 11 種の細菌 microbiomic chorioamnionitis

(miCAM とする) であり、これらの菌種は重度の絨毛羊膜炎と関連することがわかった。

宿主の miRNA の変化をみることで、絨毛膜羊膜炎の発症を予測することができると仮定し、本研究では、羊水中の miRNA 発現と 16S rDNA との相関を調べ、絨毛羊膜炎のバイオマーカーとなり得る miRNA を同定することを目的とした。

【対象と方法】

まず初めに、羊水サンプルでの候補 miRNA を探索するため、15 例の羊水中で miRNA アレイ解析を行った。その結果、候補となった miRNA の臨床的重要性を特定するために、miRNA の発現と 16S rDNA のコピー数を 63 例の羊水中で測定した。63 例の羊水のうち、絨毛膜羊膜炎群を 37 例、絨毛膜羊膜炎ではない群を 11 例、妊娠 15-17 週の染色体異常を調べる際に羊水穿刺した 15 例を対照群(コントロール群)とした。37 例の絨毛膜羊膜炎の内、21 例は miCAM で 16 例は非 miCAM であった。最後に、羊水中の miRNA の発現との関係を調査するために、血清中の miRNA の発現および 16S rDNA のコピー数を、14 例の血清で測定した（内訳は絨毛膜羊膜炎かつ miCAM の 9 人と絨毛膜羊膜炎ではない 5 例）。

妊婦の羊水および血清サンプルは、2010 年から 2018 年にかけて福岡大学病院（50 例）および国立病院機構佐賀国立病院（13 例）で収集した。羊水サンプルを得るための羊水穿刺は、無菌的に経腹超音波断層法下で経皮的に行なった。母体血清サンプルは羊水穿刺と同じ日に採取した。乳児の末梢血は出生時に採取した。miRNA microarray を行い、候補となった miRNA を、TaqMan®miRNA アッセイを使用して ddPCR を用いて miRNA 発現を定量化した。細菌量とした 16S rDNA の定量には、ユニバーサルプライマー（27Fmod 及び 338R）を使用し EvaGreen を用いた ddPCR で定量を行った。

統計はマンホイットニーU 検定、ダンの多重比較検定を主に適用し、対応のある場合は Student-t 検定を使用した。ROC 曲線を作成し、AUC と Youden インデックスを求め、ピアソンのカイ二乗検定も使用した。p < 0.05 を統計学的に有意とし、統計ソフトは Windows ベースのシステムの GraphPad Prism v8.0 および SPSS v16.0 を使用して行った。

【結果】

まず初めに miRNA アレイ解析で 10 個の microRNA が選定され、ddPCR を用いた多段階の検証で、miR-4535、miR-191-5p、および miR-1915-5p が絨毛膜羊膜炎において発現が多いことがわかった。

重度の絨毛羊膜炎の有望な羊水バイオマーカー候補として選択したこれら 3 つの miRNA と 16SrDNA を 63 例の羊水中を用いて定量した。

miR-4535、miR-191-5p、miR-1915-5p は絨毛膜羊膜炎の羊水中有意に増加していた。また、miR-4535 および miR-1915-5p の発現は羊水中の 16SrDNA のコピー数と有意に相関していた。

次に、重度の絨毛羊膜炎を予測する ROC 曲線で、miR-4535、miR-1915-5p、および miR-191-5p の AUC 値は、16S rDNA の AUC 値よりも高い診断精度を示した。

miR-4535 と miR-1915-5p の発現および 16SrDNA のコピー数は、非 miCAM グループと比較して miCAM グループで有意に増加していた。

羊水中の miR-1915-5p の発現と 16SrDNA のコピー数は、WBC 数が多い患者で有意に増加していた。miR-4535 と miR-1915-5p の発現、および羊水中の 16S rDNA のコピー数は、CRP レベルが高い患者で有意に増加していた。

miR-4535 および miR-1915-5p 発現の第 3 四分位数 (75%以上) は、新生児の敗血症疑い症例と有意に関連していた。

最後に、miCAM かつ絨毛膜羊膜炎の 9 例の血清中の miR-4535 および miR-191-5p の発現が、絨毛膜羊膜炎でない 5 人の血清中と比較して有意に増加していた。miCAM かつ絨毛膜羊膜炎の 9 人の患者において、血清中の miR-4535 の発現は羊水中の発現と有意に関連していた。16S rDNA は血清中には発現していなかった。

【結論】

早産や絨毛羊膜炎のリスクが高くなることが言われている高齢妊娠例が増加する昨今において、胎児の炎症反応症候群から新生児を守るため、絨毛膜羊膜炎の早期診断が不可欠である。今回の研究では、羊水中の 16SrDNA に加えて、miR-4535、および miR-1915-5p が、絨毛羊膜炎の診断のバイオマーカーである可能性があることを示した。

審査の結果の要旨

本論文は、早産の原因となる重度の絨毛羊膜炎を診断するバイオマーカーとしてマイクロ RNA(miRNA)に着目し、miR-4535 および miR-1915-5p が有望であることを示した。

早産のリスクが高くなることが言われている高齢妊娠例が増加する昨今において、早産の原因である絨毛膜羊膜炎の早期診断が不可欠であるが、絨毛膜羊膜炎を予測する確立した診断方法はない。miRNA は感染症等種々の疾患への関与が言われているが、絨毛膜羊膜炎と羊水中の miRNA の発現の関連についての報告はない。本研究では宿主の miRNA の変化をみることで、絨毛膜羊膜炎の発症を予測することができると仮定し、羊水中の候補となる miRNA の発現と 16S リボソーム DNA(16S rDNA) コピー数との相関を調べ、絨毛膜羊膜炎のバイオマーカーとなり得る miRNA を同定することを目的とした。

羊水および血清サンプルは、2010 年から 2018 年にかけて福岡大学病院および国立病院機構佐賀国立病院で収集された。無菌的に経腹超音波断層法下で経皮的に羊水穿刺を行ない、母体血清サンプルは羊水穿刺と同じ日に採取された。胎盤の病理学的診断はブラン分類に基づいて診断された。先行研究において、羊水中の 16S rDNA を用いて、絶対定量およびメタゲノムシーケンシングを行い、妊娠中に子宮内感染を引き起こすのは主に 11 種の細菌 microbiomic chorioamnionitis (miCAM とする) であり、これらの菌種は重度の絨毛羊膜炎と関連することが報告された。この結果をもとに 15 人の症例を miCAM により分類して miRNA microarray 解析を行った。その結果、選定された 10 個の miRNA のうち、発現が多く重度の絨毛羊膜炎の有望なバイオマーカー候補となった miRNAs(miR-4535、miR-191-5p、および miR-1915-5p) を、TaqMan®miRNA アッセイを使用して droplet digital

PCR(ddPCR) を用いて羊水中(63 症例)および血清中(14 症例)の発現を定量した。

miR-4535、miR-191-5p、miR-1915-5p は絨毛膜羊膜炎の羊水中で有意に増加していた。また、miR-4535 および miR-1915-5p の発現は羊水中の 16SrDNA のコピー数と有意に相関していた。さらに、miR-4535、miR-1915-5p、および miR-191-5p は、16S rDNA よりも高い絨毛膜羊膜炎の診断精度を示した。miR-4535 および miR-1915-5p 発現の第 3 四分位数(75% 以上)は、新生児の炎症と有意に関連していた。血清中の miR-4535 および miR-191-5p の発現は、絨毛膜羊膜炎症例で有意に増加しており、血清中の miR-4535 の発現は羊水中の発現と有意に相関していた。

1. 斬新さ

重度絨毛膜羊膜炎を宿主側の miRNA の変化と菌側の 16S rDNA からの両面から解析し、羊水中の miR-4535、miR-1915-5p、miR-191-5p が絨毛膜羊膜炎の羊水中で高発現していることをデジタル PCR の定量で示した世界初の研究である。miR-4535、miR-1915-5p が細菌量である 16S rDNA 定量と有意に相関し、絨毛膜羊膜炎を 16S rDNA 定量よりも高い精度で診断でき、新生児の炎症も予測できる可能性を示した。さらに、血液中の miR-4535 を測定することで分娩前に絨毛膜羊膜炎を診断できる可能性を示した。

2. 重要性

周産期死亡の約 7 割が早産児であり、早産予防は周産期医療の重要課題であるがその原因である子宮内感染(絨毛膜羊膜炎)を診断することは難しく、診断の遅れは母児に悪影響を与える。先行研究で出産前に羊水中の 16S rDNA を測定することで絨毛膜羊膜炎を診断できる可能性が示唆されたが、本研究では宿主側の miRNA の変化が絨毛膜羊膜炎のバイオマーカーとなり得ることを示した。さらに、侵襲的な操作である羊水穿刺を施行せずに、血液検査で絨毛膜羊膜炎を診断できる可能性があることが示された。今後は病態の解明や核酸医薬の開発に繋がることも期待される。

3. 研究方法の正確性

本研究では、miRNA microarray 解析で重度の絨毛膜羊膜炎に関連する miRNA の同定に成功している。また、定量精度が高く、高い感度をもつ第 3 世代の PCR とも言われる droplet digital PCR(ddPCR)を使用することで、羊水中に微量にしか存在しない miRNA の正確な定量がなされている。

4. 表現の明確さ

論文は注意深い研究デザインに基づき論理的且つ明確な表現がなされており、2021 年 2 月 15 日付で Future Science OA からオンライン出版されている。申請者の発表も、明確且つ分かり易いプレゼンテーションであった。

5. 主な質疑応答

質問 1：先行研究では重度の絨毛膜羊膜炎症例は 77%がウレアプラスマ関連の感染であったとのことであったが、今回の絨毛膜羊膜炎の 37 例の中でウレアプラスマ感染があったのは何%だったのか？miCAM と non-miCAM では臨床的に違いがあるのか。Non-miCAM では児の感染はなかったのか。菌に特徴があるのか。

回答 1：今回の 37 例で菌種を同定している症例は一部分なので正確な割合はわからないが、先行研究よりはウレアプラスマ感染症例は少ない割合であると思う。miCAMの方がnon-miCAMの症例と比較して重度の絨毛膜羊膜炎が多く、先行研究において児の予後も良好ではなかった。その理由としては、Non-miCAMの菌種は病原性のないような菌が dominant であったからと思われる。

質問 2：実際臨床の現場では絨毛膜羊膜炎に対してどの段階で治療介入するのか。抗生剤を投与するとしたら何を使用するのか。

回答 2：絨毛膜羊膜炎を疑った場合は羊水検査を行い、細菌が消費する糖などを判断材料として妊娠帰結を判断する。実際は、臨床的に、母体の発熱や脈拍数、母体の白血球数やCRP 値といった値も参考にして、判断していくが出産前に確定的に診断することは困難である。現在、抗生剤を使用するとしたら、アジスロマイシンを考えている。

質問 3：miR-4535 はなぜ血清中に多いのか。感染による生体の反応なのか。

回答 3：羊水中の miR-4535 は今回測定した miRNA のの中では量が一番多かったのもので、その分、血液中にも多く出現したと推測する。また、miR-4535 が CAM 特異的に発現して直接的に関連しているのか、または他の遺伝子が作用するうえで結果的に miR-4535 が上昇したのかは不明であるが、今回の研究で炎症値とも関連していることが示されたので、ベクターを使用したヒト免疫細胞への遺伝子導入実験などで機能の解明をすることは今後の課題である。

質問 4：胎児の IL-6 が上がることだが、これは胎児のものなのか母親なのか。

回答 4：羊水中に炎症が起こることで羊水中 IL-6 が上昇し胎児へ移行して胎児へも影響を及ぼすが、その結果胎児炎症反応症候群を起こし、胎児の IL-6 も上昇する場合もあると考える。

質問 5：microRNA が約 20 塩基になるまでの過程を教えてください。

回答 5：前駆体から dicer という酵素により切断されて成熟 microRNA になる。Argonaute と結合して RISC を形成して機能する。

質問 6：妊娠の高齢化と絨毛膜羊膜炎の関連は？

回答 6：母体の高齢化に伴って、妊娠期の合併症自体が増加する。感染による早産だけが純粹に増えているのではなく、合併症による早産も増加していると考えられる。また、母体の高齢化により、免疫機能も含め、基礎的な健康状態も悪くなるため、感染も起こりやすくなることが考えられる。

質問 7：本研究において使用された 16S DNA を定量するユニバーサルプライマーはこの miCAM11 種類を同定できるのか。

回答 7：先行研究と同様、今回の研究に使用した 16S rDNA 定量のプライマーは 11 種類を同定するものではなく、一般的に細菌が共通してもつ領域をターゲットとしたものであり、11 菌種を同定できるものではない。細菌量を定量するために使用した。

質問 8：マイクロアレイ解析時に、5 群で比較して抽出した microRNA は一つずつ抽出したとのことだが、実際はどれくらいの候補が上がっていたのか。

回答 8：群間の比較では各々 5 つ程度の候補であった。割合少ない数であった理由は、羊水中に発現する microRNA 自体の量が非常に少なく、すべての検体で蛍光測定できたものは限られた数であったからと考える。

質問 9：羊水中の microRNA は母体由来なのか、胎児由来なのか。なぜ母体血中にも出現するのか。

回答 9：基本的には母体由来と思われるが、細胞から漏れ出たものも血中に存在することもあるので、母体血液中にも移行した可能性がある。今後は症例を増やして母体血中の microRNA を測定しているので、児の炎症との関連も解析を深めていくことで、病態がわかる可能性がある。

質問 10：発表中に miR-4535 はイントロン microRNA ということがあったが、何かの遺伝子のイントロンにコードされているのか。

回答 10：データベースで確認したが、miR-4535 は何かをコードしているのではなく、これ自体が遺伝子として存在している特殊な microRNA である。

質問 11：CAM はすべて微生物によるものという確証はあるのか。微生物以外のファクターで炎症が起こっている可能性があるのではないか。

回答 11：今回の CAM 症例がすべて微生物による早産であるという確証はない。microRNA はホストの反応をみているため、そのほかの現象によるものを表している可能性もある。

質問 12：microRNA のレスポンスは時系列で変化するのではないか。

回答 12：今後、臨床研究で症例を増やして行うときに、治療前や治療後などで microRNA がどのように変化するのかなど、1 点を評価するだけではない検証も今後は行っていく予

定である。

質問 13 : miCAM にはグラム陽性菌やグラム陰性菌など、様々な菌があるようだが、菌種によりレスポンスも変わるのではないか。ウレアプラスマ中心に解析しているが、そのほかの菌ではどういった反応があるのか。

回答 13 : ウレアプラスマを中心として解析を進めたが、それ以外の菌が優位である場合も反応が異なるのかを考え解析を始めた。今後、それ以外の菌が優勢であった場合にも、host の反応として microRNA はどういったものが動くのかといったことは解析していく必要がある。

質問 14 : 炎症のカットオフ値はどのような基準で選択したのか。

回答 14 : 母体の炎症のカットオフ値は、絨毛膜羊膜炎を診断する基準として本邦で広く使用されている値を使用した。

本論文は、母体と新生児から採取した実際の臨床検体を対象に microarray や ddPCR を用いて、宿主の特定の miRNA の変化が絨毛膜羊膜炎のバイオマーカーとなり得ることや羊水穿刺に依らない血液検体を用いた非侵襲的な評価の可能性を明らかにした。病態の解明や臨床応用への発展性を有する独創性の高い論文であり、発表と質疑応答の結果をふまえて主査および副査の審議の結果、学位論文に値し、学位申請者についても学位授与に値すると評価された。